

**Nachweis höhermolekularer Derivate
des Fibrinogens bei asphyktischen Neugeborenen**

Albert Ernst

1974

Aus der I.Frauenklinik und
Hebammenschule der Universität München

Nachweis höhermolekularer Derivate des Fibrinogens bei
asphyktischen Neugeborenen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer hohen medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian Universität
zu München
vorgelegt von
Albert ERNST
aus Bad Tölz

1974

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.med.H.Graeff

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.J.Zander

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7.5.1974



Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis :

A	Einleitung	1
B	Material und Methoden	4
I	Material	4
II	Methoden	10
C	Ergebnisse	19
I	Elektrophorese von Plasmen der Gruppe mit positivem Äthanol-Test	19
II	Elektrophorese von Plasmen der Gruppe mit negativem Äthanol-Test	22
III	Übersichtstabellen	25
IV	Relative elektrische Beweglichkeit	31
V	Zweidimensionale Elektrophorese	32
VI	Densitometrie	33
VII	Gelphotographien	34
D	Diskussion	35
E	Zusammenfassung	40
F	Literaturverzeichnis	41

A Einleitung

Akut erworbene Störungen der Hämostase werden bei zahlreichen, ätiologisch unterschiedlichen Komplikationen in der Schwangerschaft oder unter der Geburt beobachtet (Kuhn und Graeff 1970).

Ein in den letzten zehn Jahren erkanntes wesentliches pathogenetisches Prinzip hierbei ist, unabhängig von der Ätiologie, der disseminierte Ausfall von Fibrin in der terminalen Strombahn mit Verbrauch von plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Thrombocyten (Disseminierte Intravaskuläre Gerinnung, DIG, C.H.Schneider; D.G.Mc Kee; Verbrauchskoagulopathie, H.G.Lasch; thrombohämorrhagisches Phänomen, H.Selye).

Eine der häufigsten Ursachen für die perinatalen Gerinnungsstörungen ist der perinatale Kreislaufschock. Lasch und Mitarbeiter (1967) sowie Hardaway (1966) und Mc Kee (1964) zeigten in ihren Arbeiten, daß fibrinreiche, disseminiert auftretende, intravaskuläre Gerinnsel als morphologische Äquivalente eines prämortalen Kreislaufschocks gelten.

Die Verlegung der terminalen Strombahn mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation führt zur Hypoxie der betroffenen Gewebsabschnitte. Dauer der Verlegung und Ausmaß der Minderdurchblutung sind entscheidend für den Grad der Gewebsschädigung und für die unter Umständen hieraus resultierende Nekrose (Kuhn und Graeff 1970).

Bleyl und Mitarbeiter (1969) sowie Wegener (1970) haben gezeigt, daß disseminierte intravasale Gerinnsel als Schockäquivalent bei perinatalen Todesfällen im Gefolge von Geburtskomplikationen außerordentlich häufig sind.

Weitere Berichte über perinatale disseminierte intravasale Gerinnungsvorgänge beim Kind lieferten Bohle (1960), Boyd (1965, 1966, 1967), Bleyl und Kuhn (1967), Kuhn und Mitarbeiter (1970), Bleyl (1968), Hardaway und Mitarbeiter (1969), Künzer und Mitarbeiter (1970).

Die Häufigkeit der intravasalen Gerinnungsprozesse bei intrauterin oder extrauterin verstorbenen Neugeborenen zeigt eine ausgedehnte Studie von Bleyl und Büssing, welche in 195 von 296 untersuchten Fällen intravasales Fibrin nachweisen konnten.

Im Zusammenhang mit der perinatalen intravasalen Gerinnung wird der Azidose im Rahmen einer kindlichen Asphyxie wesentliche Bedeutung beigemessen (Bleyl; Rutherford, 1966; Mammen, 1969; Kuhn und Bröcker 1970).

Das klinische Bild der Asphyxie des Neugeborenen wird bestimmt durch eine ausgeprägte perinatale Azidose mit Hypoxie in der terminalen Strombahn, mit Hypotonie im großen und kleinen Kreislauf, mit Hypovolämie, inadäquater kapillärer Perfusion, Permeabilitätsstörungen und Ödemneigung, Hämatokriterhöhung, Anstieg des Kaliums, des Phosphors, des Rest-Stickstoffs im strömenden Blut und Erniedrigung des Blutzuckers.

Die Früherkennung der disseminierten intravasalen Gerinnung kann zu einem wesentlichen prognostischen Faktor werden. Die Erfassung der ersten Stadien einer pathologischen Fibrinbildung im strömenden Blut ist geeignet eine beginnende disseminierte intravasale Gerinnung erkennen zu lassen.

Ein praktikabler Screening-Test für die disseminierte intravasale Gerinnung ist der von Godal und Abildgaard 1966 entwickelte Äthanol-Test, mit dem es gelingt, Fibrinmonomere im strömenden Blut nachzuweisen. Dieser Test hat sich zur Früherkennung der disseminierten intravasalen Gerinnung als günstig erwiesen (Streiff und Mitarbeiter, 1968; Kuhn, 1968; Kuhn und Graeff, 1970; Kuhn und Bröcker, 1970

Eine Studie von Kuhn und Bröcker (1971) hat gezeigt, daß bei einer Gruppe von Kindern mit Zeichen einer perinatalen Asphyxie statistisch signifikant gehäuft ein positiver Äthanol-Test als Äquivalent für lösliche Fibrinmonomere im Nabelvenenplasma auftrat.

In der Arbeit von H.Scholz (Inauguraldissertation, 1974) konnte die Korrelation zwischen positivem Äthanol-Test und klinischen Zeichen einer perinatalen Asphyxie deutlich gemacht werden. 57 Neugeborene wurden mit Hilfe des Äthanol-Tests untersucht, 14 mal war der Äthanol-Test positiv. Dieser Gruppe mit positivem Äthanol-Test wurde eine Gruppe von 14 Kindern mit negativem Äthanol-Test gegenübergestellt. Bei vergleichenden Untersuchungen klinischer und klinisch-chemischer Parameter der beiden Gruppen konnte mit statistisch signifikanter Häufigkeit (Wilcoxon-Test) bei der Gruppe mit positivem Äthanol-Test ein Abfall des Fibrinogens im Plasma, Abfall der Thrombocyten, erniedrigte Apgar-Werte nach einer und nach fünf Minuten post partum und Komplikationen im perinatalen Verlauf (Atemnotsyndrom in 35% der Fälle) festgestellt werden.

Parallel dazu wurden in der vorliegenden Studie dieselben Blutproben mit Hilfe der PAA-Gelelektrophorese und Intragelimmunpräzipitation untersucht. Absicht dieser Arbeit war es, Fibrin, Fibrinogen und hochmolekulare Derivate des Fibrinogens im Nabelvenenplasma normaler und asphyktischer Neugeborener biochemisch zu analysieren. Insbesondere sollte versucht werden im Nabelvenenplasma hochmolekulare Derivate des Fibrinogens nachzuweisen und eventuell in Korrelation zu Asphyxie und positiven Äthanol-Test zu setzen.

Die obenerwähnte Parallelarbeit und die vorliegende Arbeit sind, obwohl beide in sich abgeschlossene Arbeiten darstellen, als Teile einer gemeinsamen Team-Arbeit aufzufassen.

B Material und Methoden

I. Material :

1. Reagenzien :

a) Zur Blutentnahme :

a₁ Citrat-Trasylol-Gemisch, ph = 7,5 :

Na-Citrat-2-hydrat	3,80 g
TES	1,38 g
Trasylol	10,00 ml

ad 100 ml aqua dest.

TES : N-Tris-(hydroxy-methyl)-methyl-2-amino-aethan-sulfonsäure;

pk_{a20} = 7,5; Molekul.-Gew.: 229,2
(Serva, Heidelberg / 37199)

Trasylol : 1 Ampulle = 10ml = 100 000 KIE
(Kallikrein-Inaktivator-Einheiten)
(Bayer, Leverkusen/ T 653)

b) Zur beta-Alanin Fällung :

b₁ Kristallines beta-Alanin

C₃H₇NO₂; Molekul.-Gew. : 89,1
(Serva, Heidelberg / 11490)

b₂ TES-Trasylol-Citrat-Puffer :

Natr.Citr.	3,57 g
TES	1,38 g

ad 80 ml aqua dest.

dann einstellen auf ph = 7,5

Trasylol 10,0 ml

ad 100ml aqua dest.

c) Zur Elektrophorese :

c₁ Für das Sammelgel :

Lösung 1 :

1 normale HCl	48,00 ml
Tris	5,98 g
TEMED	0,46 ml

ad 100 ml aqua dest.

Tris : Tris(hydroxymethyl)-amino-methan bzw.
Amino-methylidin-tri-methanol
 $C_4H_{11}NO_3$; Fp = 170-171 Grad
(Serva, Heidelberg / 37190)

TEMED: Tetra-methyl-äthylen-diamin;
 $C_6H_{16}N_2$; Kp₇₆₀ = 119-122 Grad
Molekul.-Gew. : 116,2
(Serva, Heidelberg / 35925)

Lösung 2 :

Acryl-amid	10,0 g
Bis	2,5 g

ad 100 ml aqua dest.

Acrylamid : C_3H_5NO ; Molekul.-Gew.: 71,1;
Fp = 84-86 Grad
(Serva, Heidelberg/10675)

Bis : N,N'-methylen-bis-acryl-amid
 $C_7H_{10}N_2O_2$; Molekul.-Gew.: 154,2
(Serva, Heidelberg/29195)

Lösung 3 :

Riboflavin	4,0 mg
------------	--------

ad 100 ml aqua dest.

Riboflavin : Lactoflavin, Vitamin B₂ pharm.
 $C_{17}H_{20}N_4O_6$; Molekul.-Gew.: 376,4
(Serva, Heidelberg/34350)

Lösung 4 :

Saccharose	40,0 g
ad 100 ml aqua dest.	

Saccharose : $C_{12}H_{22}O_{11}$, reinst
(Merck, Darmstadt/7653)

c₂ Für das Trenngel :

Lösung 5 :

1 normale HCl	48,0 ml
Tris	36,3 g
TEMED	0,23 ml
ad 100 ml aqua dest.	

Lösung 6 :

Acrylamid	28,0 g
Bis	0,735 g
ad 100 ml aqua dest.	

Lösung 7 :

Persulfat	0,14 g
ad 100 ml aqua dest.	

Persulfat : Ammonium-peroxy-disulfat
(Serva, Heidelberg/13375)

c₃ Tris-Puffer (Elektrodenpuffer) :

Stammlösung : pk : 8,07

Tris	6,0 g
Glycin	28,8 g
ad 1000ml aqua dest.	

Elektrodenpuffer : ph 8,1

Stammlösung	100,0 ml
ad 1000ml aqua dest.	

Glycin : $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$ (Merck, D./4201)

c₄ Bromphenolblau (0,05%-Lösung) :

Bromphenolblau	0,04 mg
NaOH 0,1 normal	0,6 ml

ad 100 ml aqua dest.

Bromphenolblau : ph 3,0-4,6 (Merck, D./8122)

c₅ Physiologische Kochsalz-Lösung

c₆ Äther-Alkohol-Gemisch (zur Reinigung der Geräte)

d) Zur Intra-Gel-Immunpräzipitation (nach Krieg) :

d₁ Anti-Fibrinogen-Serum vom Kaninchen
(Behringwerke, Marburg; RCH 04; Batch No 1725AY)

d₂ TES-Puffer : ph : 7,5

TES	13,75 g
NaCl	5,25 g

ad 900 ml aqua dest.

NaOH 1/10 normal einstellen auf ph 7,5

ad 1000 ml aqua dest.

e) Zum Entproteinisieren :

Stammlösung : ph : 9,15

Tris	2,5 g
Glycin	1,0 g

ad 100 ml aqua dest.

Entproteinisierungspuffer :

Stammlösung	1,0 ml
-------------	--------

ad 1000 ml aqua dest.

- f) Zum Färben :
Amidoschwarzlösung 10 B
Amidoschwarz (Serva, Heidelberg/12310)
- g) Zum Entfärben :
0,7% Essigsäure
- h) Zur Aufbewahrung :
7% Essigsäure

2. Geräte :

- a) Zur Blutentnahme :
Monovetten (Sarstedt) 10 ml
Einmalkanülen
- b) Zur beta-Alanin Fällung :
Magnet-Rührer
Analysen-Waage
Kühlzentrifuge
Eiswasserbad
- c) Elektrophorese
 - c₁ Zur Herstellung des Gels :
Desaga-Arbeitsblock (zusammengesetzt aus zwei Teilen, mit Kammern zur Wasserkühlung)
Plastik-Kamm (zum Ausstanzen der Einfülltaschen)
Einspannvorrichtung für den Arbeitsblock
UV-Lampe (254 mμ) zum Polymerisieren
Glühlampe zum Polymerisieren
Einfüllspritzen für Sammel- und Trenngel
Hamilton-Spritze zum Einfüllen der Proben
waagrechte Arbeitsplatte
mit Silberfolie umhüllte Erlenmeierkolben

- c₂ Zur Durchführung der Elektrophorese :
- Puffertrogsystem (Desaga)
 - Netzgerät (Desaga, Modell 121260)
 - Gummischläuche zur Wasserkühlung
- d) Zur Intra-Gel-Immunpräzipitation :
- Plastik-Schälchen
 - Para-Film-Folie
 - elektr. Schüttelapparat
- e) Zur Entproteinisierung :
- Dialyse-Membran
 - Puffertrog mit Gitterrahmeneinsatz (Desaga)
 - Netzgerät (Desaga, Modell 121252)
- f) Zum Färben :
- breitflächiger Metallspatel
 - Färbe-Bad
- g) Zum Entfärben :
- Entfärbebad mit Gitterrahmeneinsatz (Desaga)
 - Netzgerät (Desaga, Modell 121252)
- h) Zur Aufbewahrung der Gele :
- Petri-Schalen

II. Methoden :

1. Blutentnahme :

a) Bei vaginaler Entbindung :

Unmittelbar nach Geburt des Kindes, nach Abklemmen der Nabelschnur, wurde die Nabelvene mit einer Einmal-kanüle punktiert. 9,0 ml Venenblut wurden in eine Monovette mit 1,0 ml eines Citrat-Trasylool-Gemisches vorsichtig aufgezogen. Die Durchmischung des Blutes mit dem Antikoagulans wurde durch den geschilderten Aufziehvorgang und durch einmaliges Umwenden der mit einem Para-Film verschlossenen Monovetten erreicht. Die nunmehr erreichte Trasylool-Konzentration pro ml Blut betrug 100 KIE.

Die Vene wurde nur einmal punktiert ! Waren die 10ml Blut nicht auf Anhieb zu gewinnen, so wurde die Probe verworfen.

b) Bei Schnittentbindung :

Das Nabelvenenblut wurde aus einem abgeklemmten und dann abgetrennten Teil der Nabelschnur durch einmalige Punktion gewonnen. Es wurde darauf geachtet, daß die Placenta zum Zeitpunkt des Abklemmens noch nicht gelöst war.

2. Blutaufbewahrung :

a) Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Proben in ein Eiswasserbad gestellt und ins Labor transportiert. Dort wurden die Blutproben in eine Kühlzentrifuge gegeben und bei 4 Grad Celsius und 2000g 20 Minuten lang zentrifugiert.

b) Nachdem die Zentrifuge nach 20 Minuten ruhig ausgelaufen war (kein starkes Abbremsen, sonst eventuelle Verunreinigung des Plasmaüberstandes) wurde das Röhrchen vorsichtig herausgenommen und in einen Reagenz-

glasständer gestellt. Dort wurde der Überstand vorsichtig abpipetiert, wobei ein gewisser Plasmaüberstand belassen wurde um ein Ansaugen von Erythrocyten zu vermeiden.

- c) Anschließend wurde das so gewonnene Plasma in 1 ml Portionen in Glasröhrchen abgefüllt, mit Parafilm verschlossen und bis zum Zeitpunkt der elektrophoretischen Verarbeitung bei -25 Grad Celsius in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

3. Beta-Alanin Fällung :

(modifiziert nach Straughn und Wagner, 1966)

- a) Auf einer Analysenwaage wurden 0,288 g kristallinen beta-Alanins abgewogen.
- b) Zu einem ml Plasma in einem Eiswasserbad wurden unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers 0,288 g beta-Alanin in kleinen Portionen langsam dazugegeben. Die Endkonzentration der so entstandenen Lösung war 2,5 molar. Vollständige Lösung wurde durch 20 Minuten langes Rühren erreicht.
- c) Dann wurde die 2,5 molare beta-Alanin-Lösung 10-15 Minuten lang in einer Kühlzentrifuge bei 7500 Umdrehungen/Minute und 9000 g zentrifugiert.
- d) Der Überstand wurde verworfen.
- e) Das Präzipitat wurde mit dem halben Ausgangsvolumen (= 0,5 ml) TES-Trasyllol-Puffer (pH = 7,5) wieder aufgelöst und zwar unter ständigem 30 Minuten langem Rühren mit dem Magnetrührgerät bei Zimmertemperatur.

4. Herstellung des Trenn- und Sammelgels :

- a) Zusammensetzen des Arbeitsblocks :

Man setzt die, mit einem Äther-Alkoholgemisch sorg-

fältig gereinigten Einzelteile des Desaga-Arbeits = blocks so zusammen, daß die roten Markierungspunkte auf einer Seite gegenüberliegen und dichtet durch beidseitiges gleichmäßiges Anziehen der seitlichen Schraubverschlüsse den Arbeitsblock ab. Dann setzt man die Deckplatte in die vorgesehenen Löcher und schiebt den Arbeitsblock von der Seite her auf die Gummiunterlage der Einspannvorrichtung. Nach gleich =mäßigem Ausrichten des Arbeitsblocks wird durch Um =legen der Schnellspannverschlüsse der Arbeitsblock mittels Federdruck fest auf die Gummiunterlage der Einspannvorrichtung gepreßt. Die Einspannvorrichtung mit dem Arbeitsblock wird anschließend auf eine waag =rechte Arbeitsplatte gestellt.

b) Herstellung des Trenngels :

b₁ Trenn-Gel-Lösung :

4 ml Lösung 5
8 ml Lösung 6
4 ml aqua dest.
16 ml Lösung 7

werden gut durchmischt.

b₂ Mit einer 10ml-Injektionsspritze, armiert mit einer 8-10 cm langen Metallkanüle füllt man die Gel-Kammer des Arbeitsblocks bis zu einer Höhe von 7cm ($\pm$ 10%) mit dem Trenn-Gel-Gemisch. Die Zeit zwischen dem Bereiten und dem Einfüllen des Trenn-Gel-Gemisches sollte 5 Minuten nicht über =schreiten. Grundsätzlich soll beim Einfüllen der Gellösungen die Kanülenspitze an der Glaswand entlang geführt werden und knapp die Geloberfläche berühren. Dabei soll strengstens eine Luftblasen =bildung vermieden werden. Zur Unterdrückung der Meniskusbildung überschichtet man sehr vorsichtig mit destilliertem Wasser (ca. 3mm hohe Wasserschicht

- b₃ Um Polymerisation der Gel-Lösung zu erreichen, wird diese mit der oben erwähnten UV-Lampe und einer Glühbirne 30 Minuten lang bestrahlt. Zur Erzielung einer gleichmäßigen Gelkonzentration ist darauf zu achten, daß die gesamte Gel-Lösung gleichmäßig bestrahlt wird.
- b₄ Nach der Polymerisation wird die Wasserschicht mit einer Injektionsspritze abgezogen, wobei darauf zu achten ist, daß die Geloberfläche nicht berührt wird.
- c) Herstellung des Sammel-Gels :
- c₁ Sammel-Gel-Lösung :
- 2 ml Lösung 1
 - 4 ml Lösung 2
 - 2 ml Lösung 3
 - 8 ml Lösung 4
- werden in einem mit Silberfolie umhüllten Erlenmeierkolben gut durchmischt und sofort in eine dunkle Kammer gebracht.
- c₂ Den Raum über dem Trenn-Gel spült man kurz mit dem Sammel-Gel-Gemisch aus. Anschließend steckt man den Plastikkamm mit fünf Formstäbchen (zur Bildung der Einfülltaschen) durch die Deckplatte des Arbeitsblocks bis zum Anschlag. Das Sammel-Gel-Gemisch wird wie oben für das Trenn-Gel beschrieben eingefüllt und zwar bis ca. 2-3 mm unterhalb des oberen Randes des Arbeitsblocks. Die Sammel-Gel-Länge beträgt 3cm ($\pm 10\%$).
- c₃ Die Polymerisation des Sammel-Gels erfolgt wie oben für das Trenn-Gel beschrieben.
- c₄ Nach der Polymerisation wird der Kamm mit den Formstäbchen vorsichtig herausgezogen. Das Wasser, welches sich in den Taschen angesammelt hat

wird mit Hilfe einer Injektionsspritze vorsichtig abgesaugt, wobei jede Berührung mit dem Gel peinlich vermieden werden muß.

5. Auftragen der Untersuchungsproben :

Man füllt das Untersuchungsmaterial in die durch die Form = stäbchen vorgebildeten Probetaschen. Für eine genaue Dosierung wurde eine Hamilton-Spritze verwendet. Zur Ermittlung der jeweiligen optimalen Probemengen wurden in Vorversuchen Untersuchungsproben verschiedener Konzentration und Menge elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Einbringen der Substanz werden die Probetaschen bis knapp inter Niveausgleich mit dem Sammel-Gel-Gemisch aufgefüllt, wobei ein Kommunizieren der Probetaschen peinlichst vermieden werden muß. Anschließend werden die Probetaschen durch zehnminütiges Nachpolymerisieren verschlossen.

6. Elektrophoretische Auftrennung :

a) Aufbau der Elektrophoreseapparatur :

- a₁ Man füllt das untere Elektroden-Gefäß mit Tris-Elektroden-Puffer (ph = 8,1) bis ca. 2-3 mm über die Trageleiste für den Arbeitsblock. Benötigt werden ca. 1000 ml Tris-Elektroden-Puffer.
- a₂ Der Arbeitsblock wird aus der Spannungsvorrichtung genommen, die obere Deckplatte entfernt und dann in das untere Elektrodengefäß eingesetzt und zwar so, daß sich das Sammel-Gel im oberen Anteil befindet.
- a₃ Das obere Elektrodengefäß wird auf den Arbeitsblock aufgesetzt und durch die am unteren Elektrodengefäß seitlich angebrachten Schnellspannverschlüsse befestigt. Auf gleichmäßigen Andruck ist dabei zu achten.
- a₄ Man füllt das obere Elektrodengefäß durch den Einfüllstutzen mit Tris-Elektroden-Puffer bis die Elektroden bedeckt sind (ca. 1000 ml).
- a₅ Zur Überwachung des Verlaufs der elektrophoretischen

Trennung versetzt man die Pufferlösung des oberen Elektrodengefäßes mit einer Pufferfront-Farbstofflösung : einige Tropfen einer 0,05% Bromphenolblaulösung.

b) Elektrophoretische Trennung :

- b₁ Man verbindet die Anschlußnippel der Kühlkammern des Arbeitsblocks mit der Wasserleitung und dem Abflußbecken und leitet kontinuierlich Wasser durch dieses Kühlsystem.
- b₂ Die Steckbuchsen der beiden Elektrodengefäße werden mit dem Ausgang des Desaga-Netzgerätes verbunden :
oberes Elektrodengefäß : Kathode (-)
unteres Elektrodengefäß : Anode (+)
- b₃ Man beginnt die Elektrophorese mit einer konstanten Spannung von 200 V. Der zugesetzte Farbstoff wandert in einer scharfen waagrechten Front durch den Gel-Block nach unten und markiert dabei die Proteinfrent. Die Elektrophoresedauer im Sammel-Gel beträgt 45 Minuten. Nach dieser Zeit wird die Spannung auf 500 V erhöht und bis zum Ende des Laufs durch ständiges Nachstellen konstant auf diesem Wert gehalten. Die Trennzeit beträgt 75 Minuten. Nach dieser Zeit wird die Elektrophorese beendet.
- b₄ Die relative elektrische Beweglichkeit im 5% PAA-Gel berechnet sich nach $u = l_1 \times l_2 / V \times t$ ($\text{cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$). Dabei ist : l_1 = Trenngellänge; l_2 = Wanderungsstrecke in cm ; V = Spannung während des Trennvorganges; t = Trennzeit.
- b₅ Nach Beendigung der Elektrophorese nimmt man den Arbeitsblock heraus, löst seine Schraubverschlüsse und legt das Gel durch vorsichtiges Auseinandernehmen der Arbeitsblockhälften frei. Mit einem breiten Metallspatel trennt man das Sammel-Gel ab und verwirft es.

Das Trenngel wird behutsam von der Kammerwand abgehoben und sogleich gefärbt, bzw. der Intra-Gel-Immunpräzipitation unterworfen.

7. Intra-Gel-Immunpräzipitation :

(nach Krieg, 1970)

- a) In ein 80 x 80 x 30 mm großes Plastikschälchen werden 2 ml Fibrinogen-Antiserum vom Kaninchen und 8 ml TES - Puffer ($\text{pH} = 7,5$) gefüllt.
- b) Sofort nach der Elektrophorese wird das Trenn-Gel zur Immundiffusion in das Antiserumhaltige Plastikschälchen
- c) gelegt.
- c) Das Schälchen wird mit Parafilm verschlossen und 48 Stunden lang mit Hilfe eines elektrischen Schüttelapparates mit konstanter Frequenz (ca. 60 / Minute) geschüttelt, so daß eine vollständige Umspülung des Gels mit dem Antifibrinogenserum erreicht wird.
- d) Nach 48 Stunden sind die ungefärbten weißen Präzipitate mit bloßem Auge grob orientierend zu erkennen. Sie wurden protokollarisch festgehalten. Zur genaueren Darstellung wurden die Gele anschließend entproteinisiert und gefärbt.

8. Entproteinisierung :

- a) Das immunpräzipitierte Gel wurde auf einen Gitterrahmen gelegt. Um die Gele zu fixieren, wurde um den Gitterrahmen eine Dialysemembran in drei nebeneinanderliegenden Bahnen genäht, wobei die aneinander grenzenden Ränder der drei Bahnen frei beweglich blieben. Dadurch und durch eine entsprechend lockere Umhüllung der Gele wurde eine ungehinderte Umspülung des Trenngels mit der Entproteinisierungspufferlösung und ein ungehinderter Abtransport der herausdiffundierten, nicht präzipitierten Proteine erreicht.

- b) Der Entproteinisierungstrog wurde mit ca. 1000 ml gekühlter Entproteinisierungspufferlösung (nach Krieg) gefüllt. Der Gitterrahmen mit dem eingenähten Gel wurde in den Einsatz des Entproteinisierungstrog geschoben und in das Entproteinisierungsbad gebracht.
- c) Der Entproteinisierungsvorgang wurde bei einer konstanten Stromstärke von 9 mA über ca. 48 Stunden durchgeführt.
- d) Anfangs wurde die Pufferlösung alle 10 Minuten gewechselt, nach ca. 2 Stunden in 60 minütigem Abstand, nach ca. 6 Stunden in 3-4 stündigem Abstand. In jedem Fall wurde die Pufferlösung gewechselt bei einem Spannungsabfall unter 100 V. Bei jedem Pufferwechsel wurde der Trog, das Gel, sowie die Dialysemembran beiderseits, mit aqua dest. abgespült.

9. Färben :

Nach Beendigung der Elektrophorese bzw. des Entproteinisierungsprozesses wurden die Gele 60 Minuten lang in einer Amidoschwarzlösung 10 B gefärbt.

10. Entfärben :

Die gefärbten Gele wurden in einem mit 0,7% Essigsäure gefüllten Desaga-Entfärbetrog entfärbt. Die Säure wurde bis zur vollständigen Entfärbung des öfteren gewechselt.

11. Auswertung und Aufbewahrung :

Die entfärbten Gele wurden beurteilt, photographiert und in 7% Essigsäure aufbewahrt.

12. Densitometrie :

Die fertigen Gele wurden teilweise auch mit Hilfe eines Densitometers (" Chromoscan " Joyce, Loeb, London) ausgewertet. Hierzu wurden die Gel-Scheiben geviertelt und in ein dafür vorgesehenes Gläschen gesteckt. Mit Hilfe des Densitometers wurden die Proteinmengen entsprechend der jeweiligen

Banden graphisch dargestellt.

13. Zweidimensionale Gelelektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße (nach Raymond) :

Zuerst wird eine eindimensionale Gelelektrophorese wie oben beschrieben in 5% PAA-Gel vorgenommen. Nach dem Lauf nimmt man das Gel und schneidet einen länglichen Streifen, welcher seitlich von den Banden 6 mm entfernt ist, den Startpunkt und die zu untersuchende Zone enthält, aus. Man gibt den Streifen quer in die Elektrophoresekammer, in die selbe Position, die normalerweise von den Plasmaproben eingenommen wird. Dann füllt man mit einer 7% Gellösung auf. Wenn das Gel geformt ist wird es denselben Elektrophoresebedingungen unterworfen wie oben beschrieben. Man läßt die zweite Elektrophorese länger laufen, um die langsamere Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel höherer Konzentration auszugleichen.

C Ergebnisse

I. Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der Plasmen von Kindern mit positivem Äthanol-Test :

Die Kinder 1 - 14 dieser Gruppe mit positivem Äthanol-Test sind mit den Kindern 1 - 14 mit positivem Äthanol-Test in der oben erwähnten Parallelarbeit identisch.

Diese Gruppe mit positivem Äthanol-Test zeigte im Vergleich zur Gruppe mit negativem Äthanol-Test eine signifikante (Wilcoxon-Test) Erniedrigung der Fibrinogen-Konzentration im Plasma, einen signifikanten Abfall der Thrombozyten und häufig niedrige Apgar-Werte. Meist fanden sich Zeichen einer perinatalen Asphyxie; 5 Kinder zeigten ein Atemnotsyndrom, zwei Kinder verstarben perinatal und wie = sen bei der Sektion hyaline Membranen auf (Einzelwerte siehe Tabelle 3) .

Bei der Beurteilung der elektrophoretischen Läufe wurde auf hochmolekulare Fibrin-Fibrinogenderivate geachtet, welche langsamer als Fibrinogen wandern und demzufolge über der Fibrinogenbande zu finden sind. Dabei konnten 2 Derivate, die langsamer als Fibrinogen wanderten in jedem einzelnen Fall bei Kindern mit positivem Äthanol - Test beobachtet werden.

Im Zusammenhang mit dem untersuchten Material ergab sich folgendes Bild im Einzelnen (siehe Tabelle 1) :

1. Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der nativen Plasmaproben :

a) Beurteilung des gefärbten Laufes :

Bei 11 beurteilten Läufen fanden sich in 6 Fällen zwei und mehr Banden unmittelbar über der Fibrinogenbande (siehe Abbildung 4)

Bei den restlichen 5 Läufen war eine Bande über der Fibrinogenbande sichtbar.

b) Beurteilung des immunpräzipitierten Laufes :

b₁ ungefärbt :

Bei 13 beurteilten Läufen fanden sich in 12 Fällen zwei Banden über dem Fibrinogen. In einem Fall eine Bande.

b₂ entproteinisiert und gefärbt :

Bei 13 beurteilten Läufen fanden sich in 12 Fällen zwei Banden über dem Fibrinogen. in einem Fall eine Bande.

2. Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der gefällten Plasmaproben :

a) Beurteilung des gefärbten Laufes :

Bei 9 beurteilten Läufen fanden sich siebenmal zwei und mehr Banden, in zwei Fällen eine Bande über dem Fibrinogen.

b) Beurteilung des immunpräzipitierten Laufes :

b₁ ungefärbt :

Bei 10 beurteilten Läufen fanden sich sechsmal zwei Banden, in 4 Fällen eine Bande über dem Fibrinogen.

b₂ entproteinisiert und gefärbt :

Bei 10 beurteilten Läufen fanden sich immer zwei Banden über dem Fibrinogen.

	PLASMA			FÄLLUNG		
	gefärbt	un- gefärbt immunpr.	immunpr. entprot. gefärbt	gefärbt	un- gefärbt immunpr.	immunpr. entprot. gefärbt
1	2 B	1 B	2 B	2 B	1 B	2 B
2	1 B	2 B	2 B	2 B	2 B	2 B
3	1 B	2 B	1 B			
4	2 B	2 B	2 B	2 B	2 B	2 B
5	2 B	2 B	2 B	1 B	1 B	2 B
6	3 B	2 B	2 B	4 B	1 B	2 B
7	1 B	2 B	2 B	4 B	1 B	2 B
8	2 B	2 B	2 B			
9	1 B	2 B	2 B	2 B	2 B	2 B
10	1 B	2 B	2 B	2 B	2 B	2 B
11	3 B	2 B	2 B			
12		2 B	2 B		2 B	2 B
13		2 B	2 B			
14				1 B	2 B	2 B

Tab. 1 : Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der Gruppe von Kindern mit positivem Äthanol-Test. B bedeutet eine deutlich wahrnehmbare Bande unmittelbar über der Bande des Fibrinogens

II. Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung der Plasma - Proben von Kindern mit negativem Äthanol-Test :

Die Kinder 1 - 14 der Gruppe mit negativem Äthanol-Test sind mit den Kindern der Gruppe mit negativem Äthanol-Test der oben erwähnten Parallelarbeit identisch.

Die Kinder der Gruppe mit negativem Äthanol-Test waren klinisch gesund und hatten normale Fibrinogen-Konzentrationen im Plasma und normale Thrombocytenwerte; sie zeigten einen unauffälligen perinatalen Verlauf.

Die Beurteilung der elektrophoretischen Läufe wurde wie unter I vorgenommen. Es fand sich nur gelegentlich eine Bande, nie aber zwei Banden über dem Fibrinogen. Im einzelnen ergab sich dabei folgendes Bild :

1. Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der nativen Plasmaproben :

a) Beurteilung des gefärbten Laufes :

In allen 14 beurteilten Läufen war keine Bande über dem Fibrinogen zu finden.

b) Beurteilung des immunpräzipitierten Laufes :

b₁ ungefärbt :

Bei 12 beurteilten Läufen wurde zweimal eine nicht einwandfrei gesicherte Bande über dem Fibrinogen gesehen. Die restlichen 10 Läufe zeigten keine Bande über dem Fibrinogen.

b₂ entproteinisiert und gefärbt :

Bei 14 beurteilten Läufen wurde in einem Fall eine Bande, in zwei Fällen je eine fragliche Bande über dem Fibrinogen festgestellt. Die restlichen 11 Läufe zeigten keine Bande über der Fibrinogenbande.

2. Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der gefällten
Plasmaproben :

a) Beurteilung der gefärbten Läufe :

Bei allen beurteilten Läufen konnte keine Bande über
der des Fibrinogens gefunden werden.

b) Beurteilung des immunpräzipitierten Laufes :

b₁ ungefärbt :

Bei 10 beurteilten Läufen fand sich in einem Fall
eine Bande und in einem weiteren Fall eine frag =
liche Bande über dem Fibrinogen. Die restlichen
8 Läufe zeigten keine Bande über dem Fibrinogen.

b₂ entproteinisiert und gefärbt :

Bei allen 10 beurteilten Fällen waren keine Ban =
den über dem Fibrinogen festzustellen.

	P L A S M A			F Ä L L U N G		
	gefärbt	immunpr.	immunpr. entprot. gefärbt	gefärbt	immunpr.	immunpr. entprot. gefärbt
1	O B		(1 B)			
2	O B		(1 B)			
3	O B	O B	O B			
4	O B	O B	O B			
5	O B	(1 B)	1 B	O B	O B	O B
6	O B	(1 B)	O B	O B	O B	O B
7	O B	O B	O B	O B	O B	O B
8	O B	O B	O B	O B	O B	O B
9	O B	O B	O B	O B	O B	O B
10	O B	O B	O B	O B	O B	O B
11	O B	O B	O B	O B	(1 B)	O B
12	O B	O B	O B	O B	O B	O B
13	O B	O B	O B	O B	(1 B)	O B
14	O B	O B	O B	O B	O B	O B

Tab. 2 : Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der Kindergruppe mit negativem Äthanol-Test. B bedeutet eine deutlich wahrnehmbare Bande über dem Fibrinogen. Eingeklammerte Bande waren nicht eindeutig gesichert.

III. Übersichtstabellen :

Legenden zu den Übersichtstabellen :

Tabelle 3 :

Übersichtstabelle der klinischen, klinisch-chemischen und elektrophoretischen Daten der 14 Kinder mit positivem Äthanol-Test. Nachfolgende Daten werden in der selben Reihenfolge gebracht.

Teil A :

Geschlecht (m = männlich; w = weiblich)
Geburtsgewicht in g
Länge bei Geburt in cm
Geburtsmechanismus und Indikation zu einer
eventuellen geburtshilflichen Operation
Geburtsdauer (Eröffnungsperiode, Austreibungs-
periode)
Beurteilung der elektrophoretischen Läufe :
Plasmalauf gefärbt
Plasmalauf immunpräzipitiert, entproteini =
siert und gefärbt
Fällungsläufe gefärbt
Fällungsläufe immunpräzipitiert, entpro =
teinisiert und gefärbt

Teil B :

Apgarwerte eine Minute und fünf Minuten post
partum
Thrombocyten pro ccm
Fibrinogenkonzentration im Plasma und Serum
in mg%
Blutgasanalyse : ph-Wert
Standart-Bikarbonat (mval/ml)
PCO₂ (mmhg .)

Atemnotsyndrom : Beatmung
 perinataler Tod
 hyaline Membranen
perinatale klinische Besonderheiten bzw. Sek =
 tionsergebnis

Tabelle 4 :

Übersichtstabelle der klinischen, klinisch-chemischen
und elektrophoretischen Daten der 14 Kinder mit nega =
tivem Äthanol-Test.

Teil A :

entspricht Teil A der Tabelle 3

Teil B :

entspricht Teil B der Tabelle 3

sowohl in Tabelle 3 wie auch in Tabelle 4 bedeutet :

- + : erwähntes Ereignis hat stattgefunden
- : erwähntes Ereignis hat nicht stattgefunden
- B : bedeutet eine deutlich wahrnehmbare Bande über
 der Fibrinogenbande
- (B) : bedeutet eine nicht eindeutig gesicherte Ban =
 de über der Fibrinogenbande
- : ein leeres Feld bedeutet, daß der entsprechen =
 de Wert nicht feststellbar war

Tabelle 3, Teil A :

	Ge = schl.	Geb.- Gew.	Län = Ge	Geb. - mechan.	Indik. zur evtl. Op.	Geburtsdauer Eröffn.- Periode	Austr.- Periode	Plasma Lauf Gefährdt	immun. entpr. gef.	Fällung Lauf Gefährdt	immun. entpr. gef.
1		3180 g	50 cm	spontan	-	4h 3'	7'	2 B	2 B	2 B	2 B
2	w	3900 g	52 cm	Seetio	Geb.-Still.	4h 30'		1 B	2 B	2 B	2 B
3	m	3600 g	52 cm	Vakuum	-	2h -	49'	1 B	1 B		
4	m	1650 g	42 cm	Sektio	Collum -ca	-	-	2 B	2 B	2 B	2 B
5	m	2170 g	45 cm	Zenge	Fußlage	4h 15'	17'	2 B	2 B	1 B	2 B
6	m	2210 g	44 cm	Sprecht	Steiß-Lag.	6h 15'	9'	3 B	2 B	4 B	2 B
7	w	2500 g	48 cm	spontan	-	5h 50'	23'	1 B	2 B	4 B	2 B
8	m	3760 g	50 cm	Seetio	EPH -Gest. Alt.H.-Töne	5h 30'	-	2 B	2 B		
9	w	3600 g	53 cm	Vakuum	Alt.d.kind. H.-Töne	-	-	1 B	2 B	2 B	2 B
10	w	3150 g	48 cm	spontan	-	3h 25'	5'	1 B	2 B	2 B	2 B
11	w	1670 g	44 cm	sektio	vorz.Lös.	-	-	3 B	2 B		
12	w	3450 g	52 cm	Vakuum	-	4h	12'		2 B		2 B
13		3830 g	53 cm	spontan	-	11h 40'	16'		2 B		
14	w	4000g	54 cm	spontan	-	5h 40'	10'			1 B	2 B

	Aggarwerte		Thrombo- cyten	Fibrinogkonz		Blutgasanalyse			Atemnotsyndrom			perin. klin. Besonderheit.
	1 ^{pp}	5 ^{pp}		Plasma	Serum	ph	St. Bic.	pCO ₂	Beat [#] mung	perin Tod	hyal Memb.	
1	3	5	96 000	240	1,5	7,20	15	43	+	-	-	inubiert
2	9	9	250 000	190	0	7,15	14	49	-	-	-	-
3	8	9	295 000	150	0	7,31	18	38	-	-	-	7. Tag Krämpfe
4	8	6	240 000	145	4	7,23	15,5	139	+	+	+	Sektion: hyal. Memb, Petechien
5	4	5	340 000	220	0	7,08	14,3	74	+	-	-	12 Tage beatmet
6	6	8	92 000	170	4	7,21	16	45	-	-	-	5/6 Tag pp Bewlk. u. Cyanos
7	8	9	180 000	220	4	-	-	-	-	-	-	-
8	7	7	150 000	-	7	-	-	-	-	-	-	-
9	5	7	12 000	110	4	-	-	-	+	+	+	Sektion: Blut. hyal. Memb.
10	9	-	180 000	260	0	-	-	-	-	-	-	Rh-Inkomp.
11	3	7	65 000	230	3	7,05	11	48	+	-	-	-
12	5	7	250 000	220	3	-	-	-	-	-	-	-
13	3	5	252 000	135	3	7,08	13,5	54	-	-	-	-
14	9	10	360 000	202	3	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4, Teil A :

	Ge- schl.	Geb.- Gew.	Länge	Geb.- mechan.	Indik. zur evtl. Op.	Geburtsdauer Eröffn.- Periode	Austr.- Periode	Plasma		Fällung	
								Lauf gefärbt	immun. entprot gefärbt	Lauf gefärbt	immun. entprot gefärbt
1	w	3360 g	49 cm	spontan	-	7h 15'	9'	O B	(1 B)		
2	m	4350 g	54 cm	spontgn	-	12h 50'	15'	O B	(1 B)		
3	w	4200 g	52 cm	spontan	-	3h 5'	20'	O B	O B		
4	m	2740 g	51 cm	spontan	-	4h 10'	19'	O B	B B		
5	m	4000 g	52 cm	Vakuum		5h 20'	57'	O B	1 B	O B	O B
6		3750 g	49 cm	spontan	-	4h 50'	57'	O B	O B	O B	O B
7	w	2180 g	46 cm	spontan	-	4h 50'	15'	O B	O B	O B	O B
8	w	4340 g	55 cm	spontan	-	6h 50'	11'	O B	O B	O B	O B
9	m	3210 g	51 cm	Sectio	Vagina u. Port.duplex	-	-	O B	O B	O B	O B
10		3200 g	51 cm	spontan	-	4h 10'	32'	O B	O B	O B	O B
11		3460 g	51 cm	spontan	-			O B	O B	O B	O B
12	m	4240 g	54 cm	spontan	-	19h 25'	11'	O B	O B	O B	O B
13		2650 g	48 cm	spontan	-			O B	O B	O B	O B
14				spontan	-			O B	O B	O B	O B

	Agarwerte		Thrombo- cyten	Fibrin, konz		Blutgasanalyse			Ate mottsyndrom			perinat.klin. Besonderheit.
	1 ^{pp}	5 ^{pp}		Plasme	Serum	ph	St.Bic.	PCO ₂	Beat- mung	perin. Tod	hyal. Memb.	
1	7	9	420 000	260	0	7,18	14	38	-	-	-	-
2	4	10	490 000	335	3	-	-	-	-	-	-	-
3	9	10	180 000	225	3	-	-	-	-	-	-	-
4	8	9	380 000	260	10	-	-	-	-	-	-	-
5	8	9	240 000	185	3,5	7,2	14	33	-	-	-	-
6	9	-	280 000	350	0	-	-	-	-	-	-	-
7	7	8	350 000	160	0	7,12	14,3	56	-	-	-	-
8	8	9	209 000	230	7	-	-	-	-	-	-	-
9	9	-	280 000	280	11	-	-	-	-	-	-	-
10	7	10	-	220	3	7,07	12	54	-	-	-	-
11	9	10	350 000	215	2,5	-	-	-	-	-	-	-
12	9	10	-	160	3	-	-	-	-	-	-	-
13	9	9	300 000	230	4	-	-	-	-	-	-	-
14	-	9	330 000	-	-	7,2	16	48	-	-	-	-

IV. Relative elektrische Beweglichkeit der Derivate mit höherem Molekulargewicht als Fibrinogen

Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der Fibrin-Fibrinogenderivate mit einem höheren Molekulargewicht als das des Fibrinogens, die in den Plasmaproben der Neugeborenen mit positivem Äthanol-Test gefunden wurden, ergaben sich aus der Formel:

$$u = l_1 \times l_2 / V \times t \quad (\text{cm}^2 / \text{Volt} \times \text{sec})$$

Dabei ist :

- u : die relative elektrophoretische Beweglichkeit
- l_1 : die Länge des Trenngels in cm
- l_2 : die Differenz der Wanderungsstrecke in cm
- t : die Zeit in sec
- V : die während des Trennvorgangs verwendete Spannung in Volt

Dabei ergab sich :

- 1. Für Fibrinogen : $0,43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{Volt} \times \text{sec}$
- 2. Für Derivat I : $0,27 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{Volt} \times \text{sec}$
- 3. Für Derivat II : $0,17 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{Volt} \times \text{sec}$

V. Zweidimensionale Gelelektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße (5% und 7%) :

Um zusätzliche Aufschlüsse über die molekulare Größe der beobachteten hochmolekularen Fibrinogenderivate (relative elektrische Beweglichkeit $0,17$ und $0,27 \times 10^{-5} \text{cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$) zu erhalten wurden Plasmen aus der Gruppe mit positivem Äthanol-Test mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht.

Dabei ergaben sich im 7% Gel drei Banden senkrecht unter den entsprechenden Banden im 5% Gel (siehe Abbildung 3 und 5).

Die Gele wurden photographiert und ausgewertet. Durch die Mittelpunkte der oben erwähnten Banden wurden drei Geraden ausgehend vom Startpunkt des ersten Laufes gezogen. Diese drei Geraden waren nicht identisch. Die Gerade durch den Mittelpunkt des $0,27$ -Derivates wach um 9 Grad, die Gerade durch den Mittelpunkt des $0,17$ -Derivates um 42 Grad von der Geraden durch den Mittelpunkt der Fibrinogenbande ab.

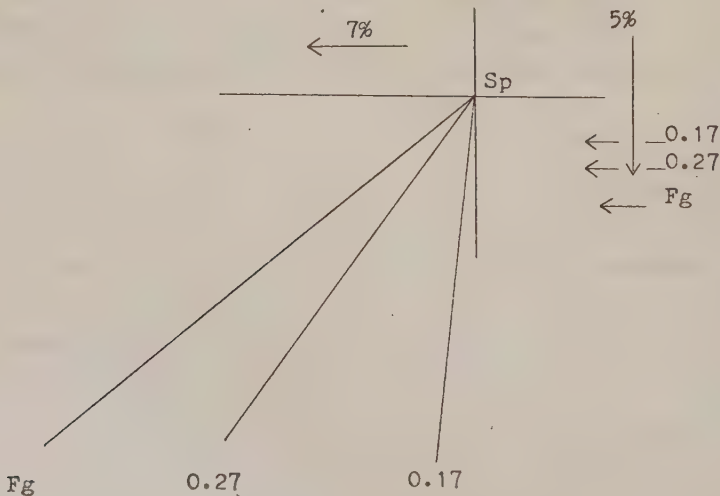


Abb. 3 : Skizze zur Auswertung der zweidimensionalen Gelelektrophorese bei einem Äthanol-positivem Neugeborenenplasma

VI. Densitometrie :

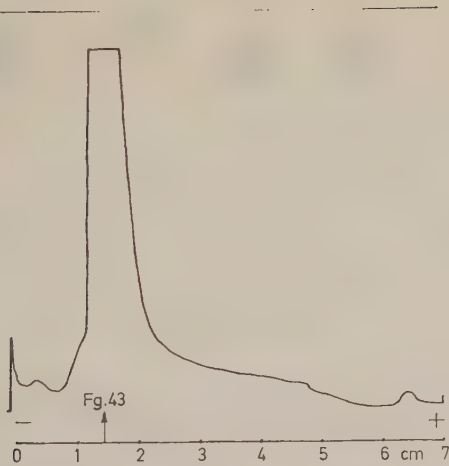


Abbildung 1 :

densitometrische Auswertung eines Gels der Äthanol-negativen Gruppe (Abszisse: Länge des Gels in cm). Man findet keine peaks vor dem Fibrinogenpeak.

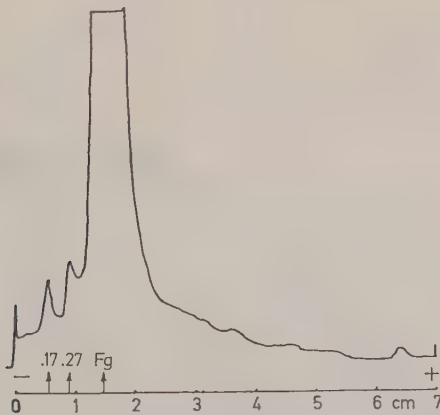
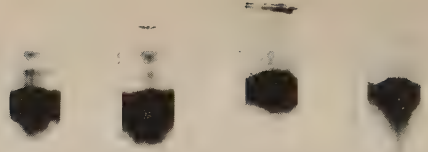


Abbildung 2 :

densitometrische Auswertung eines Gels der Äthanol-positiven Gruppe (Abszisse: Länge des Gels in cm). Man findet 2 deutliche peaks vor dem Fibrinogenpeak. Sie entsprechen der Lage der C,17 und C,27-Derivate im PAA-Gel.

VIII. Gelphotographien :



a) b) c) d)

- Abb. 4 : Abb. 4a : gefällter und gefärbter Lauf eines Äthanol-positiven Neugeborenenplasmas
- Abb. 4b : gefällter, immunpräzipitierter und gefärbter Lauf eines Äthanol-positiven Neugeborenen-Plasmas
- Abb. 4c : gefällter und gefärbter Lauf eines Äthanol-negativen Neugeborenenplasmas
- Abb. 4d : gefällter, immunpräzipitierter und gefärbter Lauf eines Äthanol-negativen Neugeborenenplasmas

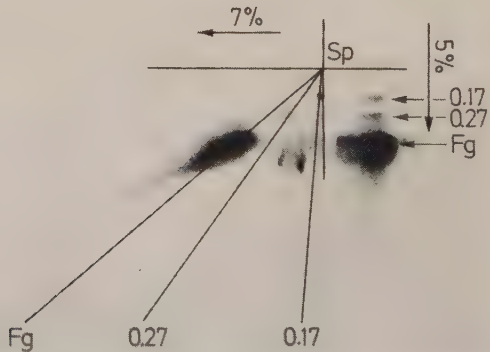


Abb. 5 : Zweidimensionale Gelelektrophorese eines Äthanol-positiven Neugeborenenplasmas

D Diskussion

Die dargelegten Daten zeigen, daß Fibrinogenderivate im Nabelve = nenblut Neugeborener auftreten können, die ein höheres Molekular = gewicht als das des Fibrinogens haben. Zwei langsamer als Fibrino = gen wandernde Komponenten wurden mit elektrophoretischen Untersu = chungen (5% PAA-Gel) in Proben mit einem positiven Äthanol-Test demonstriert. Die relativen elektrischen Beweglichkeiten dieser Komponenten waren $0,27$ und $0,17 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$. Beide Kompo = nenten wurden immunologisch dem Fibrinogen durch Intragel-Immun = präzipitation zugeordnet.

Zwei Derivate die langsamer als Fibrinogen wanderten konnten in jedem einzelnen Fall bei den Kindern mit positiven Äthanol-Test beobachtet werden.

Zieht man in Betracht, daß die Eigenschaften des Präzipitat von höhermolekularen Fibrinogenabbauprodukten weitgehend denen des Fibrinogens gleichen, scheint die 2,5-molare-beta-Alanin Fällung günstig für die Reinigung von Fibrinogen und seinen höhermoleku = laren Derivaten zu sein. Dieser Vorgang kann bei Plasmaproben bis zu einem ml angewendet werden. Die Präzipitate sind durch minima = le Mengen von Transferrin, alpha-2-Makroglobulin und Albumin ver = unreinigt. Neuere in vitro Studien (v.Hugo, Graeff, 1973) mit Fi = brinogenderivaten mit einem Molekulargewicht höher als das des Fi = brinogens zeigten, daß weniger als 10% dieser Derivate im Über = stand zurückbleiben.

Die gefundenen Derivate über dem Fibrinogen kann man mit Hilfe der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit näher charakterisieren. Dabei ergab sich für ein Fibrinogen-Derivat $0,17 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$ und für das andere $0,27 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$. Die des Fibrinogens war $0,43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$.

Um die höhermolekulare Struktur der beiden Fibrinogen-Derivate im Vergleich zum Fibrinogen zu beweisen, wurde eine zweidimensi =

onale Gelelektrophorese mit Gelen verschiedener Porengröße (5% und 7%) vorgenommen. Bei dem Wechsel vom fünfprozentigen auf das siebenprozentige PAA-Gel treten Molekülladungen gegenüber Molekülgrößen in der Beeinflussung der elektrophoretischen Beweglichkeit zurück. Die Auswertung der zweidimensionalen Gelelektrophorese ergab, daß die Gerade durch den Mittelpunkt der Bande des 0,27-Derivates um 9 Grad, die Gerade durch den Mittelpunkt der Bande des 0,17-Derivates um 42 Grad von der Geraden durch den Mittelpunkt der Fibrinogenbande abweicht.

Die durch die zweidimensionale Gelelektrophorese in Gelen verschiedener Porengröße gefundenen Aussagen bezüglich der Molekulargröße der Fibrinogenderivate wurden durch weitere Untersuchungen (v.Hugo, Graeff, 1973) bestätigt. Ein aus Einzelproben gebildeter Plasmapool wurde der Agarose-Gel-Filtration unterworfen und die eluierten Proben elektrophoretisch untersucht. Das 0,17-Derivat wurde nur in Fraktionen der vor dem Fibrinogenpeak liegenden Schulter gefunden, während das 0,27-Derivat in den Fraktionen der Schulter und in denen des ansteigenden Teils des Fibrinogen-Peaks eluiert wurde. Die Elutionspositionen dieser Derivate nach Gel-Filtration zeigen, daß das Molekulargewicht des 0,17-Derivates höher als das des 0,27-Derivates ist, und daß beide Fibrinogenderivate ein höheres Molekulargewicht als das des Fibrinogens besitzen.

In derselben Studie wurden elektrophoretische Untersuchungen in Anwesenheit von 5-molaren Harnstoff vorgenommen, um zu klären, ob die beobachteten Derivate aus kovalent gebundenen Bestandteilen bestehen.

Das 0,27-Derivat verschwand bei Elektrophorese in Anwesenheit von 5-molaren Harnstoff; statt dessen erschien eine Komponente mit einem Wanderungsverhalten entsprechend dem des Fibrinogens. Das zeigt, daß das 0,27-Derivat aus einem nicht kovalent gebundenem Komplex bestehen könnte, möglicherweise aus Fibrinogen und einem Fibrinmonomer gebildet, der in Anwesenheit von 5-molaren Harnstoff weitgehend dissoziiert.

Das 0,17-Derivat konnte auch in Anwesenheit von 5-molaren Harnstoff gezeigt werden. Das zeigt an, daß es aus kovalent gebundenen Bestandteilen besteht.

Betrachtet man die elektrophoretische Beweglichkeit, das Löslichkeitsverhalten in 5-molaren Harnstoff und die Elutionspositionen des 0,27-Derivates, könnte man vermuten, daß dieser Komplex ähnlich dem ist, der in vitro nach kurzer Exposition des Plasmas zu einer kleinen Menge Thrombin gezeigt wurde (v.Hugo, Graeff, 1972).

Plasma, das lösliche Fibrinmonomere enthielt, wurde nach einer Anweisung von Niewarowski und Gurewicz durch fünfminütige Inkubation mit kleinen Thrombinmengen hergestellt. Eine Gerinnselbildung trat dabei nicht auf (Der Äthanol-Test und der SDPS-Test waren vor der Präparation positiv). In diesem Plasma konnten v.Hugo und Graeff zwei Substanzen mit einem höheren Molekulargewicht als das des Fibrinogens nachweisen. Die eine lag im Ausschlußvolumen der Gelchromatographischen Präparation und trat bei der Elektrophorese kaum ins Gel ein. Die zweite Komponente trat im Bereich des aufsteigenden Schenkels des Fibrinogen-Peaks auf und lief in der Elektrophorese im PAA-Gel hinter dem Fibrinogen. Diese Substanz war in 5-molaren Harnstoff weitgehend unbeständig und zeigte eine relative elektrophoretische Beweglichkeit von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{V} \times \text{sec}$.

Man könnte also vermuten, daß das in vivo auftretende 0,27-Derivat auch einer Reaktion von Thrombin und Fibrinogen zuzuschreiben ist.

Es könnte auch diskutiert werden, daß das 0,27-Derivat mit dem von Shainoff und Page (1962) beschriebenen Fibrinogen-Fibrinmonomerkomplex übereinstimmt. Shainoff und Page konnten zeigen, daß sich das durch Thrombineinwirkung veränderte Fibrinogenmolekül auch mit nativem Fibrinogen verbinden kann und dabei einen kältepräzipitierbaren Komplex bildet, der als Kryoprofibrin bezeichnet wird.

Betrachtet man die elektrophoretische Beweglichkeit, das Löslich =

keitsverhalten in 5-molaren Harnstoff und die Elutionspositionen nach Agarose-Gel-Filtration des 0,17-Derivates, könnte man vermuten, daß das beschriebene Derivat ein Fibrin-I-abbauprodukt (Defektpolymer) ähnlich dem von v.Hugo und Graeff (1973) beschrieben ist.

v.Hugo und Graeff fanden nach Streptokinase-induzierter Auflösung eines durch Faktor XIII stabilisierten Plasmagerinnsels hochmolekulare Fibrinogenderivate. Die drei dabei beobachteten Fibrin-I-abbauprodukte wurden nach ihrer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit in fünfprozentigen PAA-Gel charakterisiert : Sie waren 0,23, 0,35 und 0,46 (Fibrinogen 0,43) $\times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$. Diese Produkte konnten auch in Anwesenheit von 5-molaren Harnstoff gezeigt werden.

Das Fibrin-I-abbauprodukt mit der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von $0,23 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$ zeigt ähnliches Verhalten bezüglich Löslichkeit in 5-molaren Harnstoff und relativer elektrophoretischer Beweglichkeit wie das 0,17 Derivat. Ein ähnliches Derivat wurde nach alleinigem Zusatz von Thrombin zu Plasma (in vitro) nicht beobachtet.

Man könnte also daraus schließen, daß das Auftreten des 0,17-Derivates in vivo einer kombinierten Einwirkung von Thrombin und Plasmin auf Fibrinogen mit der daraus entstehenden Bildung eines Defektpolymers zuzuschreiben ist.

Bei der Beurteilung der elektrophoretischen Läufe der Plasmen von Kindern mit negativem Äthanol-Test zeigten sich bei 14 immunpräzipitierten, entproteinisierten und gefärbten Plasmaläufen in einem Fall eine gesicherte (in zwei weiteren Fällen je eine fragliche) Bande über dem Fibrinogen, während sowohl die gefärbten Plasmaläufe, wie auch die gefärbten Fällungsläufe und alle immunpräzipitierten, entproteinisierten und gefärbten Fällungsläufe frei von Banden über dem Fibrinogen waren.

Es wurde also nur gelegentlich eine schwache Bande entsprechend der des 0,27-Derivates, nie aber das kombinierte Auftreten beider Derivate in Plasmen von Kindern mit negativem Äthanol-Test beobachtet.

Zusammenfassend kann man also sagen, daß das kombinierte Auftreten der 0,17 und 0,27-Derivate korreliert ist mit einem positiven Äthanol-Test.

Vergleicht man den Äthanol-Test und die elektrophoretische Auswertung der Plasmen mit den klinischen Parametern der Neugeborenen (siehe oben erwähnte Parallelarbeit), so findet man eine Korrelation zwischen positiven Äthanol-Test und dem Auftreten der 0,17 und 0,27-Derivate einerseits und klinischen Zeichen einer disseminierten intravasalen Gerinnung wie: statistisch signifikanter Erniedrigung der Fibrinogenkonzentration im Plasma, statistisch signifikantem Abfall der Thrombocyten und niedrige Apgarwerte auf der anderen Seite. Außerdem fanden sich in der Gruppe von Kindern mit positivem Äthanol-Test signifikant vermehrt Zeichen einer perinatalen Asphyxie, 5 Kinder zeigten ein Atemnotsyndrom, zwei Kinder verstarben perinatal und wiesen bei der Sektion hyaline Membranen auf.

Das Auftreten von Fibrinogenderivaten mit einem höheren Molekulargewicht als das des Fibrinogens im Nabelvenenplasma von Neugeborenen nur der Äthanol-positiven Gruppe könnte als weitere Anregung dienen, den Äthanol-Test nach Godal und Abildgaard als Screening-Test zur Diagnostik und Prophylaxe der perinatalen disseminierten intravasalen Gerinnung zu diskutieren.

E Zusammenfassung

1. Nabelvenenblut von 14 Neugeborenen mit positivem Äthanol-Test wurde mit Hilfe der PAA-Gel-Elektrophorese, der Intra-Gel-Immunpräzipitation, der beta-Alanin Fällung und der zweidimensionalen Gelelektrophorese untersucht.
2. Dabei traten in jedem einzelnen Fall zwei Banden über dem Fibrinogen auf.
3. Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten dieser Fibrinogenderivate waren 0,17 und $0,27 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \times \text{sec}$. Die zweidimensionale Gel-Elektrophorese ergab für sie ein höheres Molekulargewicht als das des Fibrinogens.
4. Aufgrund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihres Löslichkeitsverhaltens in 5-molaren Harnstoff könnte man vermuten, daß das 0,17-Derivat ein Fibrin-I-abbauprodukt (Defektpolymer), entstanden durch kombiniertes Einwirken von Thrombin und Plasmin auf Fibrinogen, und daß das 0,27-Derivat ein nicht kovalent gebundener Komplex aus Fibrinogen und einem Fibrinmonomer, entstanden durch Einwirken von Thrombin auf Fibrinogen, sei.
5. Den 14 Kindern mit positivem Äthanol-Test und höhermolekularen Fibrinogen-Derivaten wurde eine Gruppe von 14 Kindern mit negativem Äthanol-Test gegenübergestellt. Bei diesen trat nur gelegentlich eine Bande, entsprechend der des 0,27-Derivates, über dem Fibrinogen auf.
6. Es zeigte sich also eine Korrelation zwischen positivem Äthanol-Test und dem Auftreten höhermolekularer Fibrinogenderivate. Darüberhinaus konnte in der Parallelarbeit bei Untersuchung des Nabelvenenblutes derselben Neugeborenen eine Korrelation zwischen positivem Äthanol-Test und klinischen Zeichen einer perinatalen disseminierten intravasalen Gerinnung gefunden werden.

Literaturverzeichnis:

1. Amris, C.J. Inhibition of thromboplastik activity
 M. Hilden: by Trasylol. In vitro investigations
 concerning the mechanism of inhibition
 Scand. J. Haemat. 4 (1967) 3
2. Apitz, K.: Über Profibrin. I. Die Entstehung und
 Bedeutung des Profibrins im Gerinnungs-
 verlauf.
 Z.ges.exp.Med. 101 (1973) 552
3. Beller, F.K. Disseminatet intravascular coagulation
 Graeff, H. during the continuous infusion of en-
 Gorstein, F.: dotoxin in rabbits. Morphological and
 physiological studies.
 Amer.J.Obstet.Gynec. 103 (1969) 544
4. Beller, F.K.: Experimental animal models for DIC.
 In: Methods and theories of blood
 coagulation, hsg. von N.Bang, F.K.Beller
 E. Deutsch, E.Mammen. Academic Press
 New York; Thieme, Stuttgart 1970
5. Beller, F.K.: Ätiologie und Pathogenese von Gerinnungs-
 störungen unter der Geburt.
 Geburtshilfe und Frauenheilkunde
 28 113-132 (1968)
6. Bleyl, U.: Pathologisch-anatomische Demonstration
 zur intravasalen Gerinnung und Fibrino-
 lyse. In: Septischer Abort und bakteriel-
 ler Schock, hsg. von J. Zander.Springer,
 Berling 1968.

7. Bleyl, U. Kreislaufschock und disseminierte intra-
C.M.Büsing: vasale Gerinnung bei intrauterinem und
 perinatalem Fruchttod. Klin.Wschr.48
 (1970) 13
8. Bleyl, U. Pulmonale hyaline Membranen und perina-
C.M.Büsing taler Kreislaufschock. Virchows Arch.
B. Krempien: path.Anat. 348 (1969) 187
9. Bleyl, U. Perinatale Hämostasestörungen nach vor-
C.M.Büsing zeitiger Plazentalösung.
H. Graeff Virchows Arch.Abt.A Path.Anat. 348,
W. Kuhn: 1 - 15, 1969
10. Bleyl, U.: Zur disseminierten intravasalen Gerin-
 nung im fetalen Organismus.
 Verh.dtsch.Arb.-gemeinsch. Blutgerin-
 nungsforschung, Schattauerverl.,
 Stuttgart 1969
11. Bohle, A.: Beitrag zum Schwartzmann-Sanarelli
 Phänomen während der Schwangerschaft.
 Vergleichende Untersuchungen an müt-
 terlichen und kindlichen Organen.
 Verh.dtsch.path.Gesell. 44 (1960) 355
12. Boyd, J.F.: Disseminatet Fibrin thromboembolism in
 still births: a histological picture
 similar to one form of maternal hypo-
 fibrinogenaemia.
 J.Obstet.Gynec.Brit.Cwlth.73 (1966) 629
13. Boyd, J.F.: Disseminatet fibrin thromboembolism
 among neonatates dying within 48 hours
 of births.
 Arch.dis.Childh. 42 (1967) 401
14. Corrigan, J.J.jr: Changes in blood coagulation system
W.L. Ray associatet with septicemia.
N. May New Engl. J. Med. 279 (1968) 851

15. Davies, B.J.: Disc-elektrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci. 121: 404 (1964).
16. von Felten, A.: Coagulation studies of cord blood, with special reference to "fetal fibrinogen". P.W. Straub Thrombos.Diathes.Haemorrh. 22 (1969) 273
17. Gaffney, P.J.: Molecular aspects of fibrin clot solubilization. Nature New Biologi, 234, 281.
18. Gans, H. The uptake of fibrin and fibrin-degradations products by isolated perfused rat liver. J.T. Lowman: Blood 29 (1967) 526
19. Gmür, J.P. Blutgerinnung und Fibrinolyse im Nabelschnurblut. P.W. Straub Thrombos.Diathes.Haemorrh. 23, 82 (1970)
20. Godal, H.C. The ethanol test, an indicator of fibrinemia. U. Abildgaard P. Kierulf: Coagulation Vol.3, No.4 p 343 a 345
21. Graeff, H. Verbrauchskoagulopathie und Lysekoagulopathie bei menschlichen Äquivalenten des Sanarelli-Schwartzmann-Phänomens Kuhn, W. (generalisiertes Schwartzmann-Phänomen). Bleyl, U.: Thrombosis and Diathesis Haemorrhagica, 17, 144.
22. Graeff, H.: Identification of fibrin and/or fibrinogen degradation products in plasma Wreschniok, K. samples by FAA gel electrophoresis and v. Hugo, R. intra gel immunoprecipitation. In: Abstract volume, II. International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Oslo, 12 - 16 July, 1971, p. 150.

23. Graeff, H.: Identification of fibrinogen derivatives
v. Hugo, R. in plasma samples.
Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica,
27, 610, 1972
24. Graeff, H.: Fibrinogen derivatives with a molecular
v. Hugo, R. weight higher than the parent molecule
Kuhn, W. vein plasma of newborns.
Scholz, H. Klinische Wochenschrift (in press) 1973
Ernst, A.
25. Kuhn, W.: Gerinnungsstörungen in der Geburtshilfe
Graeff, H. G. Thieme, Stuttgart, 1970
26. Graeff, H.: Disseminierte intravasale Gerinnung
während der Infusion von Endotoxin
Ein Modellversuch am Tier. Habilitations-
schrift, Heidelberg 1968
27. Hardaway, R.M.: Syndromes of disseminated intravascular
coagulation. Thomas, Springfield 1966
28. Hathaway, W.: Disseminated intravascular coagulation
M.M. Mull in the newborn.
G.S. Pechet Pediatrics, 43 (1969) 232
29. Hartmann, J.R.: Disorders of blood coagulation during
D.A. Howell the first week of life.
L.K. Diamond
30. Karitzky, D.: Fibrinogen turnover in the premature
N. Kleine infant with and without idiopathic
W. Pringheim respiratory distress syndrom.
U. Küntzer Acta paediat.scand. 60; 465-470, 1971
31. Karitzky, D.: Fibrinogen and fibrinolysis in the
W. Pringsheim respiratory distress syndrom: Obser-
W. Künzer vation during the first day of life.
Acta paediat.scand. 59 (1970) 281

32. Künzer, W.: Die Blutgerinnung bei Neugeborenen und ihre Störungen. Klin.Wschr. 1-13 (1971)
33. Künzer, W.: Zur Physiologie der Blutgerinnung beim Neugeborenen. Dtsch.med.Wschr.89 (1964) 1005
34. Kuhn, W.: Prophylaktische Maßnahmen beim septischen Abort. In: Septischer Abort und bakterieller Schock. Hrsg. J. Zander, Springer, Berlin, 1970
35. Kuhn, W.: Disseminierte intravaskuläre Gerinnung im fetalen Organismus bei septischen Komplikationen in der Schwangerschaft. In: Beiträge zur Pathophysiologie und Chemie der Endotoxine. Hrsg. B.Urbascheck, Springer, Berlin, 1970
36. Kuhn, W.: Verbrauchskoagulopathie und Lysekoagulation bei geburtshilflichen Blutungen. Geburtsh. u. Frauenheilk. 26 (1966) 913
37. Krieg, M.: Die immunologische Identifizierung und Lokalisation der Proteinfractionen nach diskelektrophoretischer Trennung auf Polyacrylamidgel.Z.klin.Chem.klin. Biochem. 8: 293 (1970)
38. Lasch, H.G.: Pathophysiologie, clinical manifestations and therapy of consumptionscoagulopathy (Verbrauchskoagulopathie). Amer.J.Cariolog. 20 (1967) 381
39. Lasch, H.G.: Verbrauchskoagulopathie (Pathogenese und Therapie) Folia haemat. (Frankfurt) N. F. 6 (1961) 325
40. Lasch, H.G.: Methoden zur Untersuchung des Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-systems. Internist 9 (1968) 42

41. Mancini, G.:
J.P. Vaerman,
A.O. Carbonara
H.F. Heremans
A single-radial-diffusion method for the immunological quantitation of proteins. In: Proceedings XI. Colloquium proteins of the biological fluids, hsg.v.H. Peeters. Elsevier, Amsterdam 1964
42. Mc Kay, D.G.:
Disseminated intravascular coagulation. An intermediary mechanism of disease. Harper & Row, New York (1965)
43. Mc Kay, D.G.:
The pathologic anatomy of eclampsia, bilateral renal necrosis, pituitary necrosis and other acute fetal complications of pregnancy and its possible relationship to the generalized Shartzman-phenomen. Amer.J.Obstet.Gynec. 66 (1953) 507
44. Mc Kay, D.G.:
G. Miller-Berghaus
Therapeutic implications of disseminated intravascular coagulation. Amer.J.Cardiol 20 (1967) 392
45. Mc Kay, D.G.:
O. Gitlin
J.M. Craig
Immunochemical demonstration of fibrin in the generalized Shwartzman reaction. Arch.Path.67 (1959) 270
46. Maurer, H.R.:
Disk-Elektrophorese,
Walter de Gruyter & Co.,Berlin 1968
47. Niewiarowski:
St. u. Nandi,M.
Acrylamide gel elektrophoresis of fibrinogen and fibrin degradation products. British Journal of Haematology,21,71.
48. Page, E.W.:
E.B. King
J.A. Merrill
Abruptio placentae. Dangers of delay in delivery.Obstet. and Gynec.3 (1954) 385
49. Rutherford,R.:
R.L. West
R.M. Hardaway
Coagulation changes during experimental haemorrhagic shock. Lotting activity, contribution of splanchnic circulation and acidosis as controlled by Tham. Ann. Surg. 164 (1966) 203

50. Raymond, S.: Acrylamide gel electrophoresis.
In: Williams, C.A. and Chase, M.W. (eds.),
Methods in immunology and immunochemistry
Academic Press, New York, p. 47
51. Riddle, J.M.: Ultrastructural study of fibrin dissolution
via emigrated polymorph nuclear
neutrophils. Amer.J.Path.45 (1964) 805
M.J. Barnhart
52. Saling, E.: Das Kind im Bereich der Geburtshilfe.
Thieme, Stuttgart 1966
53. Schneider, Ch.: Fibrin embolism (disseminated intravas-
cular coagulation) with defibrination
as one of the endresults during abruptio
placentae.Surg.Gynec.Obstet.92 (1951) 27
54. Seegers, W.H.: The nature of blood coagulation mechanism
and its relationship to some unsolved
problems in obstetrics and Gynecology.
Suppl.Am.J.Obstet.Gynec. 61 A (1951) 469
Ch.Schneider
55. Selye, H.: Thrombohaemorrhagic Phenomena.
Thomas, Springfield, 1966
56. Shainoff, J.R.: Cofibrins and fibrin intermediates as
indicators of thrombin activity in vivo.
Circulat. Res. 8 (1960) 1013
I.H. Page
57. Stark, Ch.R.: Intravascular coagulation and hyaline
membrane disease of newborns.
Lancet 1968/I 1180
D.Abramsow
v. Erkan
58. Streiff, F. Difficultes du diagnostic biologique
du syndrome de coagulation intravascu-
laire disseminee.
A. Peters
P. Alexandre
59. Vermlyen J.: The Identification of fibrinogen
derivates in plasma and serum by aga-
rose gel filtration. In: Fibrinogen
degradation products.
Scandinavian Journal of Haematology,
Supplementum, vol. 13, p. 219, 1971
M.B. Donati
M. Verstraete

Für die Überlassung des Themas möchte ich meinem verehrten Doktorvater, Herrn Priv.-Doz.Dr.med. Henner Graeff aufrichtig danken. Er war sowohl im experimentellen Stadium der Arbeit, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse jederzeit gerne bereit mir wertvolle Hilfe zu gewähren.

Dank schulde ich auch Herrn Prof.Dr.med. Josef Zander für die Arbeitsmöglichkeit an seiner Klinik und die freundliche Übernahme der Mitberichterstattung.

Ebenso sei an dieser Stelle der kollegialen Zusammenarbeit mit Herrn Dr.R.v.Hugo gedacht. Für die gewissenhafte technische Aufarbeitung des Materials bedanke ich mich bei Frl. Eva Hoffmann. In bester Erinnerung wird mir die harmonische Zusammenarbeit mit meinem Freund und Kommilitonen Hartmut Scholz bleiben, der durch seine tatkräftige Hilfsbereitschaft wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Lebenslauf:

Am 20.9.1947 wurde ich in Bad Tölz/Obb. geboren. Meine Eltern sind der Sparkassenamtmann Josef Ernst und Maria Ernst geb. Bücherl.

- 1954: Eintritt in die Volksschule Bad Tölz.
- 1955: Umzug nach Altomünster/Lkr. Aichach
- 1958: Eintritt in die Oberrealschule Dachau
- 1960: Umzug nach Neuötting/Inn, Übertritt in die Oberrealschule Mühldorf
- 1967: Abitur an der Oberrealschule Mühldorf und Immatrikulation an der Lud.-Max. Universität München, med. Fakultät
- 1968: Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung
- 1970: Ablegung der ärztlichen Vorprüfung
- 1973: Ablegung der ärztlichen Prüfung an der Lud.-Max. Universität München und Beginn der Medizinassistentenzeit im Kreiskrankenhaus Altötting

